

## 乳酸菌食品级基因表达系统

张振中<sup>1,2</sup> 陈秀珠<sup>1</sup> 贾士芳<sup>1</sup> 陈美玲<sup>1</sup> 还连栋<sup>1,2\*</sup>

(中国科学院微生物研究所<sup>1</sup> 分子微生物学研究中心和<sup>2</sup> 微生物资源前期开发国家重点实验室,北京 100080)

**摘 要** 乳酸菌是一类重要工业菌株。最近,乳酸菌遗传学和分子生物学的研究取得长足进步,导致发展了乳酸菌食品级基因表达系统。通过介绍乳酸菌食品级基因表达系统的基本要求、食品级选择性标记、食品级诱导物及该系统的研究进展,展示了乳酸菌食品级基因表达系统的建立对研究乳酸菌的基因表达调控和它的深层次的开发利用所具有的重要意义。

**关键词** 乳酸菌,食品级,基因表达

中图分类号 Q93 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)04-0516-05

乳酸菌(LAB)是一类在食品中应用最广泛的重要工业菌株,它包括乳酸球菌、乳酸杆菌、双歧杆菌等十几个属。由于它早就被人类用于制作泡菜、酱油,生产奶酪和酸奶而家喻户晓,因而被认为是安全的(GRAS)食品级微生物。与大肠杆菌、芽孢杆菌、酵母菌相比,乳酸菌分子遗传学的研究起步较晚,对其基因转录和翻译的调控及蛋白质分泌的机制还不甚了解。最近十多年来,乳酸菌分子生物学研究取得长足进步。随着乳酸菌各类表达调控元件的分离,相继发展了一批适用于乳酸菌的克隆载体、表达载体、整合载体<sup>[1]</sup>,而乳酸菌食品级高效表达系统的构建及应用则是该领域研究的前沿和热点。本文就乳酸菌,重点是乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)食品级基因表达系统的研究进展作一介绍。

### 1 食品级系统的基本要求

乳酸菌食品级基因表达系统必须具备如下基本条件:

(1)载体必须是食品级的,不得含有非食品级功能性 DNA 片段。传统的乳酸菌载体都带有一个或多个编码特定抗生素(如红霉素、氯霉素等)抗性的基因。虽然这为遗传操作时保持一定的选择压力,对载体的选择作用是有效的。但将抗生素抗性基因投放到环境中或人和动物体内,由于抗性因子的转移,将带来生物安全性的严重后果。为了防止使用抗生素抗性标记所引起的危害,最有效的办法是用对人体安全的食品级标记替代抗生素抗性标记以建立食品级选择性标记的载体。(2)表达宿主必须是安全的、特性清楚而稳定的食品级微生物,如乳酸球菌、乳酸杆菌及其它已在食品工业中得到长期而广泛应用的菌株。必须用先进的分类方法去鉴定宿主菌,用适当的分子生物学技术,如 DNA 序列分析、PCR

扩增、DNA 杂交等手段去确认表达宿主的遗传组成。此外,食品级系统的宿主菌在生产状况下,在食品中和进入人的肠胃及消化道后必须是足够稳定的。(3)诱导物必须是食品级的,如乳糖、蔗糖、嘌呤、嘧啶、乳链菌肽等可被人食用的物质。

### 2 食品级选择性标记

目前,已成功得到了可在乳酸乳球菌及其它乳酸菌中使用的食品级标记基因,所有这些标记基因都来源于乳酸菌或在食品中有长期安全使用史的细菌。把这些标记基因整合到乳酸菌来源的多拷贝质粒中,可建立起食品级载体。用于乳酸菌食品级表达系统的食品级选择性标记主要有三类:糖类利用标记、营养缺陷型标记和编码细菌素抗性或免疫性的标记(表 1)。

#### 2.1 糖类利用标记

由于糖利用在乳酸菌工业发酵中的重要作用,所以对它进行了广泛的研究。其中以乳酸乳球菌乳糖操纵子研究得最为深入。MacCormick 等<sup>[4]</sup>将完整的乳糖操纵子整合到不含质粒的乳酸乳球菌 MG5276 的染色体上,通过双交换使 *lacF* 基因失活,产生  $Lac^-$  表型。当将克隆有 *lacF* 基因的质粒导入 *lacF* 缺陷株时就恢复了  $Lac^+$  表型。因为在乳糖中生长需要乳糖操纵子编码的完整酶系,其中包括由 *lacF* 编码的可溶性载体酶 II<sup>Lac</sup>。因此, *lacF* 基因就起选择性标记的作用。编码 *lacF* 的质粒可稳定地存在于这个乳酸乳球菌培养物中。

乳杆菌中有少数株系可利用 D-木糖作为碳源,而且与木糖发酵有关的基因也研究得较为清楚。因此,Posno 等<sup>[6]</sup>

把可发酵木糖的戊糖乳杆菌 MD353 染色体上的 *xyl* 基因簇克隆到大肠杆菌-乳杆菌穿梭载体 pLP3537, 得到重组质粒 pLP3537-*xyl*, 再将其转入不能利用木糖的干酪乳杆菌 ATCC393 中, 结果转化子获得了可利用木糖的能力, 且在含木糖培养基上的生长速度与野生株相似。这使人们可利用木糖发酵作为乳酸菌中食品级选择标记。

以蔗糖发酵作为选择性标记的食品级载体是由乳球菌质粒 pWV01 的复制起始点(*ori*<sup>+</sup>)、戊糖片球菌 PPE1.0 中的

*scrA/scrB* 基因、一段多克隆位点及一段乳球菌染色体上背景清楚的 DNA 片段所组成。*scrA/scrB* 基因编码产物与蔗糖转运和 6-磷酸蔗糖的水解有关。该系统还需要乳酸乳球菌 LL108 或 LL302, 它们可产生为 *ori*<sup>+</sup> 型质粒复制所必需的 RepA 蛋白。这个系统允许质粒通过单交换整合到乳酸乳球菌的染色体上, 在蔗糖为唯一可发酵糖的培养基上直接进行选择<sup>[7]</sup>。

表 1 乳酸菌食品级选择性标记

Table 1 The food-grade selectable markers for LAB

Selection marker	Donor	Host	Selectable marker	Reference
<b>Sugar utilization markers</b>				
Lactose fermentation	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>lacLM</i>	[ 2 ]
Lactose fermentation	<i>L. lactis</i>	<i>L. lactis</i>	<i>lacF</i>	[ 3, 4, 5 ]
Xylose fermentation	<i>L. pentosus</i>	<i>L. casei</i>	<i>xylRAB</i>	[ 6 ]
Sucrose fermentation	<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. lactis</i>	<i>scrA/scrB</i>	[ 7 ]
<b>Auxotrophic markers</b>				
Purine biosynthesis	<i>L. lactis</i>	<i>L. lactis</i>	tRNA( <i>gln</i> )	[ 8 ]
Pyrimidine biosynthesis	<i>L. lactis</i>	<i>L. lactis</i>	tRNA	[ 9 ]
<b>Resistance/immunity markers</b>				
Nisin resistance	<i>L. lactis</i>	<i>L. lactis</i>	<i>nsr</i>	[ 10, 11, 12 ]
Lactacin F immunity	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>lafI</i>	[ 13 ]
	<i>L. fermentum</i>			
	<i>L. gasseri</i>			
	<i>L. johnsonii</i>			

## 2.2 营养缺陷型标记

这一类选择性标记是建立在 tRNA 抑制基因基础上的。Dickley 等<sup>[8]</sup>以此构建了一个乳酸菌食品级载体 pFG1, 它由乳酸乳球菌一个质粒的最小复制子、乳球菌的赭石突变(Ochre)抑制基因 *supB* 及一段人工合成的含有 11 个限制酶切点的多克隆位点组成。载体大小约 2kb。当与嘌呤生物合成途径中的基因发生赭石突变的宿主联合使用时, *supB* 便可用作选择性标记。依照同样的策略, 用琥珀突变(Amber)抑制基因 *supD* 构建了可抑制嘧啶营养缺陷的一个食品级载体 pFG200<sup>[9]</sup>。无义突变抑制基因较之其它食品级标记有许多优点。它使用灵活, 可在多种培养基上进行选择, 其基因产物是 RNA, 而不是蛋白质, 因此不会有酶活性或抑菌作用。但 tRNA 抑制基因可能会导致多效效应, 这是它不利的因素。

## 2.3 细菌素抗性或免疫性标记

在乳酸乳球菌中发现有一些菌株不产乳链菌肽(Nisin), 但对乳链菌肽具有抗性<sup>[14, 15]</sup>。经基因克隆和 DNA 测序证明乳链菌肽抗性(*nsr*)基因编码一个疏水蛋白, 与乳链菌肽产生菌中发现的乳链菌肽免疫决定子无关。*nsr* 基因已被克隆到 pVS40、pFM011 等乳球菌质粒上, 在含乳链菌肽的培养基上选择到乳链菌肽抗性转化子<sup>[10-12]</sup>。

*lafI* 基因是约氏乳杆菌 VPI 11088 产生的 Lactacin F 的免疫基因。将含有 *lafI* 基因的质粒 pTRK434 转化到发酵乳杆菌 NCDO 1750 后, 可用加入 Lactacin F 的培养基选择转化子<sup>[13]</sup>。*lafI* 标记片段小, 通用性好, 可在许多对 Lactacin F 敏感的乳杆菌中使用。此外, 嗜酸乳杆菌的 Acidocin A 和 Acidocin B 的结构基因和免疫基因已分别在干酪乳杆菌与植物乳杆菌和发酵乳杆菌中表达<sup>[16, 17]</sup>。这都给利用细菌素免疫基因作为食品级标记提供了可能。

与许多抗生素抗性一样, 也存在细菌素抗性或免疫性自发突变的问题。克服这个问题的办法是用一种以上细菌素抗性或免疫性作为选择性标记或将细菌素抗性或免疫性与另一种食品级选择性标记联合使用。已经构建了可产多种细菌素的乳酸菌, 在培养基中加入 2 种甚至 3 种细菌素将大大降低抗性或免疫性自发突变的频率。

## 3 食品级诱导物

在乳酸菌中已发现一些启动子可被特定的诱导物或环境因子所诱导。用这些启动子构建的食品级基因诱导表达系统可使目的基因的高效表达与宿主菌的生长分开, 以减少基因表达产物对宿主菌造成的不利影响。乳酸菌中被用作

食品级诱导信号的有:糖类、温度、pH、盐和噬菌体感染等。而目前最有效的一个食品级诱导表达系统是 NICE (Nisin-controlled expression) 系统,该系统在加入诱导物乳链菌肽后,诱导效率可达 1000 倍以上。

### 3.1 糖类

乳糖操纵子是研究得最为清楚的乳球菌操纵子,已从分子水平上阐明了乳糖利用的控制机制。它的 *lacA* 启动子不受乳糖分解代谢物阻遏,而受自我调节的 *LacR* 阻遏物控制。乳糖的诱导作用是通过乳糖分解代谢的中间物塔格糖-6-磷酸激活 *LacR* 阻遏物实现的。这已用 *lacA* 启动子和 *lacR* 启动子与费氏弧菌荧光素酶基因 *luxAB* 进行转录融合,经体内生物发光测定而得到证实。当加入乳糖时这两个启动子都有诱导作用,*lacR* 启动子是 7 倍,*lacA* 启动子是 5 倍<sup>[18]</sup>。

除乳糖外,木糖也有诱导作用。乳酸菌中糖类的诱导效率随启动子的不同及糖种类的不同而有差异(表 2)。

表 2 乳酸菌糖诱导表达系统

Table 2 Sugar-inducible expression systems for LAB

Strains	Sugar	Promoter	Regulator	Induction factor	Reference
<i>Lactococcus lactis</i>	Lactose	<i>lacR</i>	LacR	~ 10	[ 18 ]
<i>Lactococcus lactis</i>	Lactose	<i>lacA</i>	LacR	~ 10	[ 19 ]
<i>Lactococcus lactis</i>	Lactose	<i>lacA/T7</i>	LacR	~ 20	[ 20 ]
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Xylose	<i>xyIA</i>	XylR	~ 60	[ 21 ]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Lactose	<i>lacS</i>	GalR	~ 10	[ 22 ]

### 3.2 细菌素

最著名的细菌素就是前面提到的 NICE 系统<sup>[23]</sup>。乳链菌肽是广泛用作天然食品防腐剂的一种小肽,对人体安全无毒。它的生物合成涉及 11 个基因。在其生物合成基因簇中有 3 个启动子,其中 *nisA* 启动子和 *nisF* 启动子可被乳链菌肽诱导。Kuipers 等<sup>[24]</sup>提出了一个乳链菌肽生物合成自我调节的模型。首先,起传感蛋白作用的 NisK(组氨酸激酶)识别乳链菌肽分子(浓度低到 0.05ng/mL),然后 NisK 使 NisR 磷酸化,NisR 作为一个应答调节物再激活 *nisA* 启动子,从而导致下游基因的转录。这种诱导作用与诱导物乳链菌肽的浓度在一定范围内成正比例。目前,NICE 系统已被成功应用于许多乳酸菌和乳酸菌以外的菌株,包括乳球菌、乳杆菌、链球菌、肠球菌和芽孢杆菌<sup>[25-28]</sup>。

最近,在 sakacinP、plantaricinA 和 carnobacteriocin 生物合成基因簇中也发现了这种双组分调节系统<sup>[29,30]</sup>。如果这些细菌素对人体是安全的,那么它们都将有可能用作食品级表达系统的诱导物。

### 3.3 环境因子

3.3.1 热诱导:对乳酸乳球菌温和性噬菌体  $\phi$ rlt 的 DNA 全序列测定发现了一个与溶源性有关的调控区。它由转录方向相反的 2 个基因启动子( $P_1$  和  $P_2$ )组成,分别控制 *rro* 基因(编码一个阻遏物)和 *tec* 基因(编码 Cro 的拓扑异构体)的表

达。 $P_2$  的表达受  $R_{ro}$  阻遏<sup>[31]</sup>。通过获得一个热不稳定的  $R_{ro}$  阻遏物变异体,从而实现该系统的热诱导表达。当将允许生长温度(24℃)提高到 42℃时,结果使  $P_2$  控制的表达诱导了约 500 倍<sup>[32]</sup>。虽然热诱导作用不易应用于工业生产,而且容易诱导其它热激基因表达,但该系统具有与大肠杆菌  $P_L$  启动子高度相似的潜力。

3.3.2 pH 诱导:最近从乳酸乳球菌中分离到受 pH 调节的启动子。该启动子( $P_{170}$ )受低 pH、低温等因子的正调节。Madsen 等对其进行了缺失突变,结果使  $P_{170}$  的 pH 诱导作用提高 150 倍<sup>[33]</sup>。

3.3.3 盐诱导:Sanders 等<sup>[34]</sup>分离到一个氯化物诱导型乳酸乳球菌启动子。采用缺失作图、核苷酸序列分析和引物延伸鉴定了这个盐诱导启动子,并用这个启动子表达了乳酸乳球菌 Cre 重组酶<sup>[35]</sup>。

## 4 乳酸菌食品级基因表达系统

### 4.1 依据 *lac* 操纵子控制的食品级表达系统

Platteeuw 等<sup>[5]</sup>用 *lacF* 基因作为选择标记,将来源于大肠杆菌的  $\beta$ -葡糖醛酸酶基因(*gusA*)克隆于载体上乳球菌乳糖操纵子 *lacA* 启动子下游,同时插入氨肽酶 N 基因(*pepN*)的转录终止子以增加载体和克隆 DNA 的遗传稳定性。由于受体菌乳酸乳球菌 NZ3000 不含质粒,染色体上的 *lacF* 基因有一个符合读框的缺失,构建成一个乳糖诱导的食品级基因表达系统。当在乳糖培养基上生长时,该载体可稳定存在于乳酸乳球菌 NZ3000 中,同时使  $\beta$ -葡糖醛酸酶基因在 *lacA* 启动子的控制下获得高表达。Payne 等<sup>[19]</sup>将乳糖操纵子整合到乳球菌的染色体上,然后将来源于单核细胞增生利斯特氏菌噬菌体 LM-4 中的 *lys* 基因也整合到乳球菌染色体上,使其表达由 *lac* 启动子控制。这样 LM-4 *lys* 的表达和细胞裂解都受培养基中乳糖的调节。

### 4.2 *nisA* 启动子控制的食品级基因表达系统

de Ruyter 等<sup>[36]</sup>巧妙地构建了由 *nisA* 启动子控制的乳酸菌食品级基因表达系统。他们将编码乳球菌噬菌体  $\phi$ US3 的 *holi*(*lytH*) 和 *lysi*(*lytA*) 基因克隆到表达载体 pNZ8010 上,得到重组质粒 pNZ8011,使 *lytH* 和 *lytA* 这 2 个基因的表达都受该质粒上 *nisA* 启动子控制。受体菌 *L. lactis* NZ3900 含有 *nisRK* 信号传导基因,同时染色体上整合有编码氨肽酶 N 的基因(*pepN*)。当加入诱导物乳链菌肽(0.01 $\mu$ g/mL)到含 pNZ8010 的 *L. lactis* NZ3900 中时,并不影响 *L. lactis* NZ3900 生长,而加入到含有 pNZ8011 的 *L. lactis* NZ3900 中,就诱导 *lytH* 和 *lytA* 的表达,导致菌株裂解,使活菌数下降超过 10 000 倍,并将氨肽酶 N 释放到发酵培养基中。由于这个新的基因表达系统的表达控制很严格,且所有的元件都来自乳酸菌,预计不久将应用于诱导和缩短干酪的成熟期。

### 4.3 嘌呤调节的食品级基因表达系统

Kibenich 和 Johansen<sup>[37]</sup>将乳酸乳球菌噬菌体  $\phi$ vML3 中的 *lys* 基因融合到乳酸乳球菌嘌呤生物合成操纵子的一个启动子下游,由于该启动子受生长培养基中的嘌呤核苷酸负

调控,结果,随着生长培养基中的嘌呤被逐渐消耗,携带有 *lys* 基因的乳球菌培养物自溶也逐渐增加。在加入嘌呤后,就抑制了嘌呤操纵子启动子的转录,使乳球菌培养物的自溶推迟了大约 8h。因此,这个食品级基因表达系统可按预定的时间表去控制乳球菌培养物的自溶作用。

## 5 结 语

多种高度复杂的食品级基因表达系统正在乳酸菌中建立起来,这不仅有助于了解乳酸菌的基因功能和表达调控的规律,而且也是乳酸菌后基因组时代所需要。最近,乳酸乳球菌的基因组测序已经完成,其它几个乳酸菌起子菌株和益生菌菌株的基因组测序也已启动,乳酸菌基因组学已提上日程<sup>[38]</sup>。另外,乳酸菌食品级基因表达系统的建立也是乳酸菌深层次的开发利用所需要。因为乳酸菌食品级基因表达系统中的载体、受体及诱导物均为食品级,可直接制成口服制剂,免去一般基因工程菌所需的繁琐、复杂的后提取工艺,为基因工程生产安全、廉价的生物制品开辟新途径。所以,食品级的乳酸菌工程菌本身及其表达产物可直接应用于食品工业、医药工业和保健业等领域,有其巨大的应用前景和潜在的商业价值。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] de Vos W M. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, **2** :289 ~ 295
- [ 2 ] Hashiba H, Takiguchi R, Jyoho K *et al.* Establishment of a host-vector system in *Lactobacillus helveticus* with beta-galactosidase activity as a selective marker. *Bioscience Biotech Biochemistry*, 1992, **56** :190 ~ 194
- [ 3 ] de Vos W M, Boerrigter I, van Rooijen R J *et al.* Characterization of the lactose-specific enzymes of the phosphotransferase system in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem*, 1990, **265** :22554 ~ 22560
- [ 4 ] MacCormick C A, Griffin H G, Gasson M J. Construction of a food-grade host/vector system for *Lactococcus lactis* based on the lactose operon. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, **127** :105 ~ 109
- [ 5 ] Platteeuw C, van Alen Boerrigter I J, van Schalkwijk S *et al.* Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** :1008 ~ 1013
- [ 6 ] Posno M, Heuvelmans P T, van Giezen M J *et al.* Complementation of the inability of *Lactobacillus* strains to utilize D-xylose with D-xylose catabolism-encoding genes of *Lactobacillus pentosus*. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57** :2764 ~ 2766
- [ 7 ] Leenhouts K, Bolhuis A, Venema G *et al.* Construction of a food-grade multi-copy integration systems in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotech*, 1998, **49** :417 ~ 423
- [ 8 ] Dickely F, Nilsson D, Hansen E B *et al.* Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense suppressors and construction of a food-grade cloning vector. *Mol Microbiol*, 1995, **15** :839 ~ 847
- [ 9 ] Sørensen K I, Larsen R, Kibenich A *et al.* A food-grade cloning system for industrial strains of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** :1253 ~ 1258
- [ 10 ] von Wright A, Wessels S, Tynkkynen S *et al.* Isolation of a replication region of a large lactococcal plasmid and use in cloning of a nisin resistance determinant. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56** :2029 ~ 2035
- [ 11 ] Froseth B R, McKay L L. Molecular characterization of the nisin resistance region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC3. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57** :804 ~ 811
- [ 12 ] Liu C Q, Harvey M L, Dunn N W. Cloning of a gene encoding nisin resistance from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M189 which is transcribed from an extended -10 promoter. *J Gen Appl Microbiol*, 1997, **43** :67 ~ 73
- [ 13 ] Allison G E, Klaenhammer T R. Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, *lafI*, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** :4450 ~ 4460
- [ 14 ] Duan K, Harvey M L, Liu C Q *et al.* Identification and characterization of a mobilizing plasmid, pND300, in *Lactococcus lactis* M189 and its encoded nisin resistance determinant. *J Appl Microbiol*, 1996, **81** :493 ~ 500
- [ 15 ] TANG S (汤莎), CHEN X (陈秀珠), YANG W (杨巍) *et al.* Isolation and characterization of a plasmid pTSS0, which encodes nisin resistance determinant in *Lactococcus lactis* TS1640. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2001, **41** :536 ~ 541
- [ 16 ] Kanatani K, Oshimura M, Sano K. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61** :1061 ~ 1067
- [ 17 ] Leer R J, van der Vossen J M, van Giezen M *et al.* Genetics analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol*, 1995, **141** :1629 ~ 1635
- [ 18 ] Eaton T J, Shearman C A, Gasson M J. The use of bacterial luciferase genes as reporter genes in *Lactococcus*: regulation of the *Lactococcus lactis* lactose genes. *J Gen Microbiol*, 1993, **139** :1495 ~ 1501
- [ 19 ] Payne J, MacCormick C A, Griffin H G *et al.* Exploitation of a chromosomally integrated lactose operon for controlled gene expression in *lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, **136** :19 ~ 24
- [ 20 ] Wells J M, Wilson P W, Norton P M *et al.* *Lactococcus lactis*: high level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol Microbiol*, 1995, **8** :1155 ~ 1162
- [ 21 ] Lokman B C, Heerikshuizen M, van den Broek A *et al.* Regulation of the *Lactobacillus pentosus* *xylAB* operon. *J Bacterial*, 1997, **179** :5391 ~ 5397
- [ 22 ] Mollet B, Knol J, Poolman B *et al.* Directed genomic integration, gene replacement, and integrative gene expression in *Streptococcus thermophilus*. *J bacterial*, 1993, **175** :4315 ~ 4324
- [ 23 ] Kuipers O P, de Ruyter P G G A, Kleerebezem M *et al.* Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J Biotechnol*, 1998, **64** :15 ~ 21
- [ 24 ] Kuipers O P, Beerthuyzen M M, de Ruyter P G G A *et al.* Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem*, 1995, **270** :27299 ~ 27304
- [ 25 ] Kleerebezem M, Beerthuyzen M M, Vaughan E E *et al.* Controlled

- ducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4581 ~ 4584
- [ 26 ] Eichenbaum Z, Federle M J, Marra D *et al.* Use of the lactococcal *nisA* promoter to regulate gene expression in Gram-positive bacteria: comparison of induction level and promoter strength. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 2763 ~ 2769
- [ 27 ] Pavan S, Hols P, Delcour J *et al.* Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study *in vivo* biological effects. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 4427 ~ 4432
- [ 28 ] Bryan E M, Bae T, Kleerebezem M *et al.* Improved vectors for nisin-controlled expression in Gram-positive bacteria. *Plasmid*, 2000, **44**: 183 ~ 190
- [ 29 ] Huhne K, Axelsson L, Holck A *et al.* Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* LB674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sake* strains. *Microbiol*, 1996, **142**: 1437 ~ 1448
- [ 30 ] Quadri L E N, Kleerebezem M, Kuipers O P *et al.* Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J Bacteriol*, 1997, **179**: 6163 ~ 6171
- [ 31 ] Nauta A, van Sinderen D, Karsens H *et al.* Inducible gene expression mediated by a repressor-operator system isolated from *Lactococcus lactis* bacteriophage  $\phi$ lt. *Mol Microbiol*, 1996, **19**: 1331 ~ 1341
- [ 32 ] Nauta A, van den Burg B, Karsens H *et al.* Design of thermolabile bacteriophage repressor mutants by comparative molecular modeling. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**: 980 ~ 983
- [ 33 ] Madsen S M, Arnau J, Vrang A *et al.* Molecular characterization of the pH-inducible and growth phase-dependent promoter P<sub>170</sub> of *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol*, 1999, **32**: 75 ~ 87
- [ 34 ] Sanders J W, Leenhouts K, Burghoorn J *et al.* A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Mol Microbiol*, 1998, **27**: 299 ~ 310
- [ 35 ] Sanders J W, Venema G, Kok J. A chloride-inducible gene expression cassette and its use in induced lysis of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4877 ~ 4882
- [ 36 ] de Ruyter P G G A, Kuipers O P, Meijer W C *et al.* Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**: 976 ~ 979
- [ 37 ] Kibeni A, Johansen E. Food-grade expression of the  $\phi$ ML3 lysin gene in *Lactococcus lactis*. Abstract G4 of the 5<sup>th</sup> Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism, and Applications, Federation of European Microbiological Sciences, 1996
- [ 38 ] Courvalin P, de Vos W M, Rubens C E. Genetics of *Streptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*. *ASM News*, 1998, **64**: 501 ~ 504

## Food-grade Gene Expression Systems for Lactic Acid Bacteria

ZHANG Zhen-Zhong<sup>1,2</sup> CHEN Xiu-Zhu<sup>1</sup> JIA Shi-Fang<sup>1</sup> CHEN Mei-Ling<sup>1</sup> HUAN Lian-Dong<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>( Research Center for Molecular Microbiology, <sup>2</sup> State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China )

**Abstract** Lactic acid bacteria (LAB) are important industrial microorganism used in the production and preservation of food-stuffs. Recently, considerable advances have been made in the genetics and molecular biology of LAB. These have resulted in the construction of food-grade gene expression systems for these bacteria. This paper aims to review the essential features for food-grade systems, food-grade selection markers, food-grade controlled gene expression and food-grade inducible signaling molecule, and recent developments on food-grade cloning and expression systems for LAB. These gene expression systems have great potential for studies on gene expression and regulation in LAB and a variety of bioprocessing application in industrial fermentations.

**Key words** lactic acid bacteria, food-grade, gene expression

Received: 10-18-2001

This work was supported by Grants from the 9th Five Years Plan Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KY95-J1-331) and the Innovation Foundation of the Chinese Academy of Sciences.

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62652851; Fax: 86-10-62581447; E-mail: huanld@sun.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>